

64-69

第13卷第1期
1998年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 13 No. 1
Mar. 1998

新型戊型肝炎诊断试剂盒的研制及其应用

戎广亚 孙杰[✓] 周继文 任继明 张芳

(北京解放军第302医院临床诊断试剂研究中心,北京 100039)

R512.630.4

摘要 用 HEV ORF3 合成肽及 ORF2 重组抗原研制成新型 HEV EIA 诊断试剂盒。与 Genlabs HEV EIA 检测比较,灵敏度和特异性均达 100% (60/60)。三批试剂精密性测定均 < 10%。该试剂盒置 4℃ 8 个月或 37℃ 4 d 保持稳定。检测不同肝炎患者 HEV 抗体,发现急性非甲非乙非丙肝炎中有 63.2%, 甲肝有 13.4%, 乙肝有 8.3%, 丙肝有 6.6%, 正常人群为 2.9%。所研制的戊型肝炎诊断试剂盒,灵敏度高,特异性强,精密性好,稳定性合格。适用于戊型肝炎诊断及戊肝病毒感染的流行病学调查。

关键词 戊型肝炎病毒, 合成肽, 重组抗原, 诊断, 试剂盒

戊型肝炎病毒(HEV)经胃肠道传播,在我国新疆地区曾爆发流行,全国各地均有散发病例。国际上 Genlabs 公司推出以基因重组抗原组装的 EIA 诊断试剂,国内用合成肽作抗原,检测肝炎病人 HEV 抗体^[1-3],但与国外试剂相比灵敏度稍低。为了进一步提高诊断 HEV 感染的敏感性,我们将 HEV ORF3 合成肽和 HEV ORF2 基因重组抗原混合包被,制备了新型戊肝诊断试剂,对试剂盒的灵敏度、特异性、精密性、稳定性及临床应用进行了系统研究。

材料和方法

- 1 ORF3 多肽抗原** 多肽抗原合成纯化按文献[1]。
- 2 基因重组抗原的制备** 利用融合蛋白表达载体 PGEX-3X 表达了戊型肝炎病毒第二读框区(ORF2 402~660)优势抗原表位,表达抗原溶于水,可利用商品化的谷胱甘肽 Sepharose-4B 亲和层析柱得到纯化的抗原(此抗原制备的详细过程另文发表)。
- 3 血清标本** 病人血清来自解放军第 302 医院住院患者及新疆自治区防疫站。健康人血清来自北京及河北正常人群。
- 4 EIA 试剂的制备** 按选择的最佳包被浓度,ORF3 合成肽及 ORF2 基因重组抗原 2 μg/mL,用 50 mmol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液作相应稀释,包被反应板(丹麦 Nunc 板),每孔加 100 μL,室温包被过夜,次日甩掉剩余的液体,加入含 10% 胎牛血清的封闭液(封闭液中加入海藻糖、蔗糖、苯乙酰磺酰氟等稳定剂),每孔加 150 μL,室温过夜,用 10 mmol/L pH7.4 的含 1% Tween-20 磷酸盐缓冲液(PBS-T)洗一遍,室温除湿干燥,干燥后板条和干燥剂一同密闭包装,4℃ 保存。样品稀释液和酶结合物稀释液为 20 mmol/L pH7.4 的 PBS-T(含 10% 小牛血清、海藻糖、细胞色素-C、铁氰化钾等稳定剂)。酶结合物为辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (Sigma 产品)。阴性对照为正常人混合血清(甲、乙、丙、丁、戊型肝炎标志均呈阴性)。阳性对照为 HEV 感染

收稿日期:1997-04-14,修回日期:1997-06-12

* 参加研究的还有本中心王志杰、梁克为、杨守纯

的病人混合血清。显色剂 A 为 50 mmol/L 的 pH5.0 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(内含 0.8% 过氧化脲),显色剂 B 为 5 mmol/L 柠檬酸-0.5 mmol/L EDTA(内含 0.5% TMB·2HCl)。终止剂为 2 mmol/L 硫酸。

5 EIA 检测程序 取出抗原板,每孔加入 100 μ L 样品稀释液,依次加入 5 μ L 待检血清,同样加阴性(3 孔)和阳性(2 孔)对照血清,混匀,放 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,用 PBST 洗 5 遍,每孔加显色剂 A 50 μ L,显色剂 B 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 10 min,加入 50 μ L 终止剂,在酶标仪上读取 A 值(450 nm)。临界值(Cut off) = 0.25 + 阴性对照均值。凡样品 A 值大于临界值者判为阳性,反之为阴性。

结 果

1 EIA 包被抗原的选择 我们将 ORF3 合成肽、ORF2 重组抗原、ORF3 合成肽及 ORF2 重组抗原混合,分别包被微孔板检测 10 份 HEV 阳性血清,结果见表 1。

表 1 10 份 HEV 阳性血清 EIA 检测结果
Table 1 Result of 10 HEV positive sera by EIA

抗原 Antigen	样品 Sample									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ORF3 合成肽(Sp)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
ORF2 重组抗原(Re)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Sp + Re	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

从表 1 可见 10 份 HEV 阳性血清单用 ORF3 合成肽 ORF2 重组抗原不能检出全部阳性血清。而将 ORF3 合成肽和 ORF2 重组抗原联合使用,可以检出 10 份 HEV 阳性血清。

2 包被用水的选择 我们在实验中发现水的纯度对包被效果有较大影响,分别用蒸馏水、去离子水及超纯水配制包被液,检测 5 份阴性血清及 5 份阳性血清,结果见表 2。

表 2 包被用水的纯度对 EIA 检测结果的影响
Table 2 Influence of water purity on EIA

水 Water	HEV 阴性血清 A 值 HEV negative sera A value					HEV 阳性血清 A 值 HEV positive sera A value				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
蒸馏水 Distilled water	0.186	0.231	0.254	0.197	0.214	2.153	1.821	1.584	0.893	0.796
去离子水 Deionized water	0.116	0.161	0.138	0.125	0.089	2.078	1.767	1.601	0.878	0.698
纯水 Pure water	0.013	0.021	0.004	0.010	0.003	2.164	1.897	1.531	0.987	0.786

不同纯度水包被对于阳性结果影响不大,但对阴性标本影响很大。蒸馏水包被阴性血清值高,甚至可能出现假阳性结果。用纯水配制包被液检测阴性本底很低。

3 封闭液中稳定剂的应用 酶标板包被抗原后,进行封闭处理,可以降低 EIA 检测阴性本底,同时使包被抗原活性保持稳定。我们比较了封闭液,在封闭液中分别加入海藻糖、蔗糖、苯乙酰磺酰氟等稳定剂后酶标板的稳定性,结果见表 3。封闭液中加入稳定剂后,酶标板经 37 $^{\circ}$ C 4 d 后检测,阳性血清 A 值无明显变化,封闭液中不加稳定剂,阳性血清 A 值明显下降。

4 酶结合物稀释液中稳定剂的应用 酶标记抗体稀释至工作浓度后,活性很不稳定。我们在稀释液中加入海藻糖、铁氰化钾、细胞色素-C 等稳定剂,观察稳定剂对辣根过氧化物酶标记羊

抗人 IgG 的保护作用。结果见表 4。

表 3 稳定剂对抗原活性的保护作用

Table 3 Effects of the stabilizers on HEV antigen activity

温度 Temperature	吸光度 A value (450 nm)			
	1	2	3	4
4℃	1.058	1.074	0.101	1.034
37℃ 4 d	0.432	0.987	1.053	1.020

- 1: 封闭液 (Blocking Sol)
 2: 封闭液内含海藻糖 (Blocking Sol + Trahalose)
 3: 封闭液内含蔗糖 (Blocking Sol + Sucrose)
 4: 封闭液内含苯乙酰胺磺酰基 (Blocking Sol + PMSF)

表 4 稳定剂对酶结合物的保护作用

Table 4 Effects of the stabilizers on conjugate

温度 Temperature	吸光度 A value (450 nm)			
	1	2	3	4
4℃	0.970	0.956	0.981	0.973
37℃ 4 d	0.003	0.997	0.904	0.897

- 1: 稀释液 (Diluent)
 2: 稀释液内含海藻糖 (Diluent + Trahalose)
 3: 稀释液内含铁氰化钾 (Diluent + Potassium ferricyanide)
 4: 稀释液内含细胞色素 C (Diluent + Cyto C)

加入稳定剂后, 酶标抗体至 37℃ 4 d 后, 活性无明显变化, 而不加稳定剂酶标抗体活性几乎完全丧失。

5 整套试剂盒稳定性观察 将预包被抗原板、对照血清、样品稀释液、酶结合物、显色剂 A、显色剂 B、终止剂全部试剂分别存放 4℃ 冰箱及 37℃ 温箱观察试剂盒不同时间稳定性变化。结果见表 5。全套试剂置 37℃ 4 d, 4℃ 8 个月检测阳性血清 A 值无明显变化。说明试剂盒稳定性很好。

表 5 HEV EIA 试剂盒稳定性观察结果

Table 5 Stability observation of HEV EIA kit

试剂盒批号 Lot of EIA kit	吸光度 EIA A value (450 nm)								
	4℃ 月 (Month)				37℃ d (Day)				
	1	2	4	6	8	1	2	3	4
960715	1.183	1.180	1.150	1.089	1.053	1.180	1.210	1.134	1.062
960730	1.231	1.195	1.178	1.154	1.105	1.235	1.199	1.183	1.104
960815	1.153	1.161	1.147	1.140	1.039	1.158	1.159	1.101	1.130

6 EIA 临界值的确定 检测 300 份健康人群的血清临界值确定以阴性均值 + 5S, 临界值 = 0.071 + 5 × 0.038 = 0.261。试剂盒阴性对照一般为 0.005 ~ 0.020。所以临界值 = 0.250 + 阴性对照均值。

7 试剂盒精密性 取阳性低值血清 1 份, 检测三批试剂, 每批测定 10 孔, 结果计算变异系数分别为 6.1%、7.8%、7.3%。

8 与 Genlabs HEV EIA 检测比较 从表 6 可见三批试剂盒检测结果与 Genlabs 试剂检测结果完全一致。阳性符合率、阴性符合率均达 100%。

9 本试剂盒与国内主要厂家试剂盒检测比较 我们选择了国内五个主要免疫诊断试剂厂家生产的 HEV 诊断试剂盒, 检测 Genlabs HEV EIA 检测过的 60 份 HEV 阳性血清及 60 份 HEV 阴性血清。结果阳性率分别为: 上海科华为 85.0%、洛阳华美为 90.0%、厦门新创为 91.7%、珠海丽珠为 91.7%、北京 GBI 为 93.3%、本试剂盒为 100%。阴性符合率五个厂家均为 96~98%, 本试剂盒为 100%。

表 6 与 Genlabs HEV EIA 试剂检测比较

Table 6 EIA comparison with Genlabs HEV EIA in detecting acute hepatitis patients sera

试剂盒批号 Lot of EIA kit	Genlabs HEV EIA		
	+ 符合率	- 符合率	
	+ Conformity rate (%)	- Conformity rate (%)	
960915	+	60(100)	0
	-	0	60(100)
961115	+	60(100)	0
	-	0	60(100)
970115	+	60(100)	0
	-	0	60(100)

10 试剂盒用于检测不同肝病患者血清中 HEV 抗体 结果见表 7。新疆 HE 流行患者血清中 HEV 抗体检出率为 98%，急性非甲非乙非丙肝炎中 HEV 抗体检出率为 63.2%，甲型肝炎病人为 13.4%，乙型肝炎病人为 8.3%，丙型肝炎病人为 6.6%，正常人群为 2.9%。

表 7 不同肝炎患者 HEV 抗体的检测结果

Table 7 Detection of anti-HEV IgG among patients with different hepatitis by HEV EIA kit

分组 Groups	例数 No. of cases	HEV 抗体 Anti-HEV	
		阳性数 Positive No.	阳性率 (%) Positive rate
新疆 HE 流行患者血清 Hepatitis E	890	872	98.0
急性非甲非乙非丙 Acute NANBNC hepatitis	310	196	63.2
甲型肝炎 Hepatitis A	194	26	13.4
乙型肝炎 Hepatitis B	276	23	8.3
丙型肝炎 Hepatitis C	287	19	6.6
正常人群 Normal persons	545	16	2.9

讨 论

评价诊断试剂盒的标准应包括灵敏度、特异性、精密性及稳定性等方面。戊型肝炎病毒抗原表位主要分布于第二(ORF2)和第三(ORF3)读框^[1-8]。理想的诊断试剂应包含 ORF2 及 ORF3 主要抗原表位^[3,6]。本研究以 ORF3 合成肽及 ORF2 重组抗原混合包被制备戊肝诊断试剂,与美国 Genlabs HEV EIA 检测比较,灵敏度和特异性均达 100% (60/60)。影响试剂灵敏度和特异性最重要的因素是抗原选择,但酶标板包被工艺对试剂特异性、灵敏度均有影响。我们研究证实,不同纯度的水作为包被用水对 EIA 结果影响很大。用纯水配制包被液,可以显著降低阴性本底,增加试剂的特异性。在制备试剂时,可以使用较高浓度的酶标二抗,增加阴阳反差。酶联试剂精密性一般要求 $\leq 15\%$,本试剂盒三批精密性测定结果均 $< 10\%$,说明该试剂精密性良好。评价诊断试剂另一重要指标为稳定性,即试剂制备后,经过一段时间贮存和

运输,活性是否改变,是试剂内在质量的重要方面,先进的酶联试剂盒抗原预包被在微孔板上,酶结合物稀释至工作浓度,显色剂配成液体,以上三种成份活性易丢失。如何使其稳定是一重要研究课题,有关这两方面的报道甚少。我们的研究结果证明:海藻糖、蔗糖、苯乙酰磺酰氟加入封闭液中可有效地保护戊肝抗原活性。海藻糖、铁氰化钾、细胞色素-C加入酶结合物中可以使稀释至工作浓度的HRP-羊抗人IgG活性稳定。全部试剂盒组份放37℃4d或置4℃8个月,检测阳性血清A值无明显变化,证明试剂盒稳定性合格。

在检测不同肝炎患者HEV抗体,发现新疆HE流行患者有98%,急性非甲非乙非丙型肝炎中有63.2%,比Lok等^[7]报道56%的阳性率高,甲型肝炎有13.4%,乙型肝炎有8.3%,丙型肝炎有6.6%,正常人群有2.9%HEV抗体的阳性,说明HEV感染在我国普遍存在,是急性非甲非乙非丙型肝炎主要致病因子,可以单独致病,也常和其它型肝炎发生重叠感染加重病情,应引起重视。

本研究研制的戊型肝炎诊断试剂经国内外厂家HEV诊断试剂对比检测和应用,初步表明其性能和美国Genlabs HEV诊断试剂相当,其灵敏度明显高于国内主要厂家生产的HEV试剂盒,该试剂的全面质量评价有待于临床应用过程中做大量标本的检测考核和更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 戎广亚,乔小江,张建宗等.以合成肽作抗原的酶联免疫吸附法诊断戊型肝炎病毒感染.中华医学检验杂志,1994,17:75
- 2 戎广亚,乔小江,张建宗等.以人工合成多肽为抗原检测戊型肝炎病毒抗体方法的建立及初步应用.中西医结合肝病杂志,1993,3:9
- 3 戎广亚.戊型肝炎检测技术研究动态.中西医结合肝病杂志,1993,3:33
- 4 Khudyakov Y E, Favorov MO, Jue DI. *et al.* Immunodominant antigenic regions in a structural protein of the hepatitis E virus. *Virology*, 1994, 198:390
- 5 Yarbough, PO, Tam AW, Fry KE *et al.* Hepatitis E virus: identification of type - common epitopes. *J Virol.* 1991, 65:5790
- 6 Dawson GJ, Chau KH, Cabal CM *et al.* Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J Virol Method*, 1992, 38:175
- 7 Lok As, Kwan WK, Moeckli R *et al.* Seroepidemiological survey of hepatitis E in Hong Kong by recombinant-based enzyme immunoassays. *The Lancet*, 1992, 340:1205
- 8 毕胜利,江永珍,赵洪兰等.戊型肝炎病毒结构区基因在大肠杆菌中的表达及其在诊断中的应用.病毒学报,1996,12:118

Preparation and Application of the New Type Hepatitis E Virus Diagnostic Kit

Rong Guangya Sun Jie Zhou Jiwen *et al*

(Center for diagnostic Reagents, 302nd Hospital of PLA, Beijing 100039)

Abstract Solid-phase enzyme immunoassay (EIA) kit was developed for detecting anti-HEV IgG by using synthetic peptide from the open reading frame (ORF)3 and recombinant antigens from ORE2. When the kit was applied to detect HEV antibodies in sera of clinical patients the results were quite consistent with the HEV diagnostic kit from Genlabs. The consistent rate reached 100% (60/60). CV of three lot kit was less than 10%. The kit was stable for 8 months at 4 °C or for 4 days at 37 °C. The kit was used to detect anti-HEV IgG among clinically different patients with acute Non-A, Non-B, Non-C hepatitis, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C and normal human group, the positive rates were 63.2%, 13.4%, 8.3%, 6.6%, 2.9%, respectively. The data indicated that the HEV EIA kit is sensitive, specific and stable, may be used to detect antibody of Hepatitis E Virus among patients and normal human group.

Key words Hepatitis E Virus, Synthetic peptide, Recombinant antigen, Diagnostic kit